

LC-QTOF/MSによるスクリーニング分析マニュアル

2024年3月 東京大学
新福優太
2024年6月 加筆修正

本マニュアルは、飛行時間型の液体クロマトグラフ質量分析計LC-QTOF/MS (Exion LC-X500R, AB Sciex)を用いて、水質試料中の要調査項目を対象としたスクリーニング分析を行うためのものである。

はじめに。

本稿にて記載する分析・解析手順を実施する際には、下記表1の電子ファイルを用いる。

表1 添付ファイルの一覧

ファイル名	ファイル概要
Manual.docx	本wordファイル
AIQS_LC_Doff_48_2in.lcm	分析条件 (SCIEX OSにてLC Methodとして使用)
AIQS_LC_Doff_48_2in.lcm-journal	分析条件 (SCIEX OSにてLC Methodとして使用)
AIQS_SWATH_pos_0.07s_35-15.msm	分析条件 (正イオン化法用、SCIEX OSにてMS Methodとして使用)
AIQS_SWATH_pos_0.07s_35-15.msm-journal	分析条件 (正イオン化法用、SCIEX OSにてMS Methodとして使用)
AIQS_SWATH_neg_0.07s_35-15.msm	分析条件 (負イオン化法用、SCIEX OSにてMS Methodとして使用)
AIQS_SWATH_neg_0.07s_35-15.msm-journal	分析条件 (負イオン化法用、SCIEX OSにてMS Methodとして使用)
Mix_Pos.i.qmethod	定量メソッド (正イオン化法用)
Mix_Nega.qmethod	定量メソッド (負イオン化法用)
Mix_Pos.i.mqcal	検量線データ (正イオン化法用)
Mix_Nega.mqcal	検量線データ (負イオン化法用)
DB_X500R.xlsx	分析対象物質のデータベース、および補正保持時間の計算

1. 測定方法の概要

採水した実環境試料中に含まれる有機物質を、固相抽出法により濃縮した後、LC-QTOF/MSによる要調査項目収録物質のスクリーニング分析に供する。スクリーニング分析実施時の分析条件は表1に記載されているものを使用する。特にMS用の分析条件は、イオン化法に応じて使い分ける。

取得した分析データを用いて、対象成分を定量する。定量はSCIEX OSソフトウェアの”Analytics”モードにより実施する。その際、上記の.qmethodファイルおよび.mqcalファイルを使用する（詳細は後述）。

2. 分析対象物質の選定

2023年10月現在、要調査項目として207項目が設定されている。本分析法では207項目のうち、単一の標準物質が利用可能であり且つエレクトロスプレーイオン化法によりイオン化可能と予想された物質（別添Excelのスプレッドシートを参照）をスクリーニング対象とした。無機物であるもの、分子量が50未満のもの、単一の標準物質を入手できないものについては、分析困難であるとして検討対象から除外した。

表中の番号は、要調査項目に定められている項目ごとの通し番号と同一である。アクリル酸エステル類やアミノフェノール類のように、1項目につき複数物質が対象となるものについては、末尾に別途番号を付与している。

3 . LC-QTOF/MS分析条件

本検討における要調査項目のスクリーニング分析のためのLC-QTOF/MS分析条件を表2-1, 2-2, 2-3に示す。下記の分析条件は、門上らによる既報 (Kadokami et al. (2019) *Anal. Chem.*, **91**, 7749-7755) と同様であり、分析実施時には、LC用分析条件としてSCIEX OS上で“AIQS_LC_Doff_48_2in”を指定する。またMS用分析条件は表1に記載したものから、イオン化法に応じて適宜選択する。すなわち、**LC-QTOF/MS分析は正イオン化法と負イオン化法について、別途実施する。**

※以下の分析条件は.qmethodファイルから読み込み可能である。そのため、SCIEX OS上での個別設定は不要。

表2-1 MS Method分析条件
*TOF MSおよびTOF MSMSで同じ値を用いる

項目	設定値
Method Duration	50.0 min
Ion source gas 1	50 psi
Ion source gas 2	80 psi
Curtain gas	30
CAD gas	7
Temperature	350
Experiment	SWATH
Spray Voltage	5500 (正イオン化)/-4500 (負イオン化)
TOF start mass*	50 Da
TOF stop mass*	1000 Da
Accumulation Time	0.1 sec (TOF MS)/ 0.07 sec (TOF MSMS)
Declustering Potential	80 V
DP Spread	0 V
Collision energy	5 V
CE Spread	0 V
Charge state	1

表2-2 Mass Table(TOF MSMS)の設定値（正イオン化/負イオン化とともに同一のものを使用）

	Precursor ion start mass (Da)	Precursor ion stop mass (Da)	Declustering potential (V)	DP Spread (V)	Collision energy (V)	CE spread (V)
1	50.0000	150.5000	60	0	35	15
2	149.5000	213.7000	60	0	35	15
3	212.7000	230.1000	60	0	35	15
4	229.1000	245.8000	60	0	35	15
5	244.8000	269.1000	60	0	35	15
6	268.1000	289.1000	60	0	35	15
7	288.1000	304.7000	60	0	35	15
8	303.7000	316.0000	60	0	35	15
9	315.0000	326.9000	60	0	35	15
10	325.9000	338.2000	60	0	35	15
11	337.2000	349.1000	60	0	35	15
12	348.1000	361.5000	60	0	35	15
13	360.5000	375.0000	60	0	35	15
14	374.0000	387.7000	60	0	35	15
15	386.7000	400.5000	60	0	35	15
16	399.5000	412.1000	60	0	35	15
17	411.1000	424.9000	60	0	35	15
18	423.9000	440.5000	60	0	35	15
19	439.5000	474.7000	60	0	35	15
20	473.7000	509.3000	60	0	35	15
21	508.3000	891.5000	80	0	35	15
22	890.5000	1000.0000	80	0	35	15

表2-3 LC Method分析条件（正イオン化/負イオン化とともに同一のものを使用）

項目	設定値
移動相	A: 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 B: 5 mM 酢酸アンモニウムメタノール溶液
カラム	Inertsil ODS-4HP 3 μm, 2.1×150 mm
Injection Volume	2 μL
Stop Time	50.0 min
Flow	0.3 mL/min
Pressure Limit	0.0 MPa (Minimum)/45.0 MPa (Maximum)
Oven Temperature	40°C
Sampling Speed	5.0 μL/s
Cooler Temperature	5°C
Flow Program	B Conc.=5(0分), 95(0-30分), 95 (30-40分), 5(40.01分), 5(40.01-50分)

4. 試薬

LC-QTOF/MS分析実施時の必要試薬とそのグレードについては、表3-1に示す通りである。

表3-1 使用する試薬の一覧

超純水	LC/MSグレード
メタノール	LC/MSグレード
1M 酢酸アンモニウム溶液	高速液体クロマトグラフ用
内標準物質	イミダクロプリド-d4 ¹⁾ , ジノテフラン-d5 ²⁾ , ¹³ C6-ジウロン ³⁾ , メタミドホス-d6 ⁴⁾ , メソミル-d3 ⁴⁾ , カルベンダジム-d4 ⁴⁾ , ピリミカルブ-d6 ⁴⁾ , イマザリル-d5 ⁴⁾ , エトフェンプロックス-d5 ⁴⁾
キャリブレーション試薬	ESI Positive/Negative Calibration Solution for X500B

1) Cambridge Isotope Laboratories DLM-8512-1.2

2) Cambridge Isotope Laboratories CLM-9594-1.2

3) 関東化学 49863-82

4) AIQS-LC用内部標準Mix（林純薬工業、品番99056217）

※内標準物質については、他社同等品でも差し支えない。

5. 機器のスタートアップ

分析開始に先立ち、以下に示す手順によって機器類をスタートアップする。

① 移動相およびオートサンプラのページ

移動相Aライン、Bラインとともにページし、ライン内部に気泡が残っていないことを確認する。
これと並行して、オートサンプラを25分間ページする。

② カラム洗浄

移動相B（5 mM 酢酸アンモニウムメタノール溶液）を用いて、流速0.3 mL/minにてカラムを洗浄する。この時カラム温度は40°Cとし、最低でも35分間（＝カラム体積の約20倍量）洗浄する。その際、MSのダイバートバルブポジションを“A”に設定して、カラムを通過した移動相は廃棄する。イオン源に電圧等は印加しない。

③ システム全体の平衡化

”Equilibrate”機能を用いて所定のメソッドを選択し、システム全体を平衡化する。平衡化は最低30分間実施する。

※平衡化の時点でカラム圧力が40 MPaを上回る場合、カラムの目詰まりなどが疑われる所以、適宜カラムの洗浄や交換を実施する。

④ MS Check

”MS Check”を用いて質量分析部をチューニングする。感度不足等でMS Checkに失敗する場合、以下のいずれかの方法で対応する。

- Positive / Negative TOF MS Tuning, Q1 unit Tuningなど、より高度なTuningを実施する。
- SCIEX X500 QTOFシステムメンテナンスマニュアルを参照しつつカーテンプレート、オリフィスプレート、Qjet, Q0を洗浄する。QjetおよびQ0を洗浄する場合、真空を解除する必要があるため注意。

①-④を完了後、分析サンプル数に応じてバッチファイルを作成する。”Batch”にて、MS Method, LC Method, Vial position等をサンプルごとに指定する。通常、MS Method, LC Methodはサンプルに関係

なく共通のものを使用する。また、分析中の実測精密質量値の変動を防ぐため”Auto Calibrate”機能を用いる。2時間に1回程度（2-3 injectionに1回程度）の頻度でキャリブレーションされるよう調整する。CDS Channelは正イオン化法での分析時には1、負イオン化法での分析時には2を選択する。

*機器の状態を安定化するため、分析開始直後の2時間程度は、超純水やメタノールなどをBlankとして分析することが望ましい。

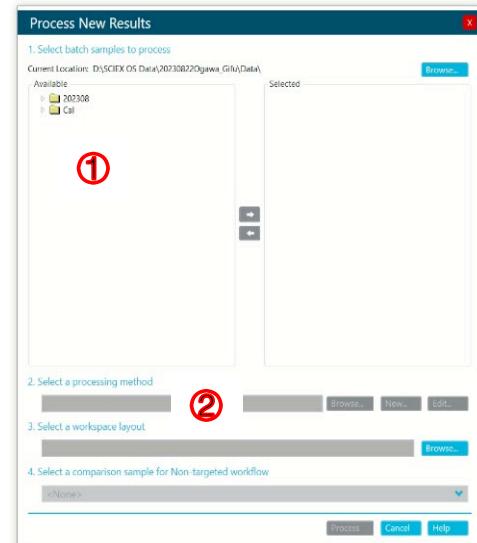
6. 分析データの解析

※下記の解析手順は、SCIEX OSソフトウェア操作マニュアルも併せて参考のこと。スクリーニング分析と同様、データ解析も正イオン化法と負イオン化法で別々に実施する。

※以下の分析条件は.mqcalファイルから読み込み可能である。そのため、SCIEX OS上での個別設定は不要。

① 分析データの保存先を参照し、解析対象とするデータを右のSelected欄に追加する。

② ①で選択したデータに対して適用する解析メソッドを選択する。この時、表1に記載のMix_Pos.qmethodまたはMix_Nega.qmethodを選択する。②以降の”3. Select a workspace layout”および”4. Select a comparison sample for Non-targeted workflow”については、通常は選択不要。



③ 内部標準物質（IS）の実測保持時間に基づき、各物質の予想保持時間を補正する。別添のExcelファイル(DB_X500R.xlsx)上に、内部標準物質9種の実測保持時間を入力すると補正後の予想保持時間が自動で計算されるため、得られた値をペーストして用いる。詳細は同Excelファイルを参照。また、補正值の算出方については、Appendix-3にて後述する。

④ 解析を実行すると、画像のようなマスター テーブルが得られるので、以下の操作により各物質を定量する。本稿においては、東京大学において予め作成した検量線データ(Mix_Pos.mqcal, およびMix_Nega.mqcal)を用いて各物質を定量する。

Index	Sample Name	Sample Type	Component Name	Actual Conc...	Compon...	Type
1	Mix_0.1ppb_1	Standard	1,3-Diphenylguanidine-1	0.10	Quantifiers	
316	Mix_0.1ppb_2	Standard	1,3-Diphenylguanidine-1	0.10	Quantifiers	
631	Mix_0.2ppb_1	Standard	1,3-Diphenylguanidine-1	0.20	Quantifiers	
946	Mix_0.2ppb_2	Standard	1,3-Diphenylguanidine-1	0.20	Quantifiers	
12...	Mix_0.4ppb_1	Standard	1,3-Diphenylguanidine-1	0.40	Quantifiers	
15...	Mix_0.4ppb_2	Standard	1,3-Diphenylguanidine-1	0.40	Quantifiers	
18...	Mix_1ppb_1	Standard	1,3-Diphenylguanidine-1	1.00	Quantifiers	
22...	Mix_1ppb_2	Standard	1,3-Diphenylguanidine-1	1.00	Quantifiers	
25...	Mix_2ppb_1	Standard	1,3-Diphenylguanidine-1	2.00	Quantifiers	
28...	Mix_2ppb_2	Standard	1,3-Diphenylguanidine-1	2.00	Quantifiers	
31...	Mix_4ppb_1	Standard	1,3-Diphenylguanidine-1	4.00	Quantifiers	
34...	Mix_4ppb_2	Standard	1,3-Diphenylguanidine-1	4.00	Quantifiers	
37...	Mix_10ppb_1	Standard	1,3-Diphenylguanidine-1	10.00	Quantifiers	
40...	Mix_10ppb_2	Standard	1,3-Diphenylguanidine-1	10.00	Quantifiers	
44...	Mix_20ppb_1	Standard	1,3-Diphenylguanidine-1	20.00	Quantifiers	
47...	Mix_20ppb_2	Standard	1,3-Diphenylguanidine-1	20.00	Quantifiers	
50...	Mix_40ppb_1	Standard	1,3-Diphenylguanidine-1	40.00	Quantifiers	
53...	Mix_40ppb_2	Standard	1,3-Diphenylguanidine-1	40.00	Quantifiers	
56...	Mix_100ppb_1	Standard	1,3-Diphenylguanidine-1	100.00	Quantifiers	
59...	Mix_100ppb_2	Standard	1,3-Diphenylguanidine-1	100.00	Quantifiers	
63...	Mix_200ppb_1	Standard	1,3-Diphenylguanidine-1	200.00	Quantifiers	
66...	Mix_200ppb_2	Standard	1,3-Diphenylguanidine-1	200.00	Quantifiers	
69...	Mix_400ppb_1	Standard	1,3-Diphenylguanidine-1	400.00	Quantifiers	
72...	Mix_400ppb_2	Standard	1,3-Diphenylguanidine-1	400.00	Quantifiers	
75...	Mix_1000ppb_1	Standard	1,3-Diphenylguanidine-1	1000.00	Quantifiers	
78...	Mix_1000ppb_2	Standard	1,3-Diphenylguanidine-1	1000.00	Quantifiers	
81...	Sep2022_Aiko_1	Unknown	1,3-Diphenylguanidine-1	N/A	Quantifiers	
85...	Sep2022_Chivo_1	Unknown	1,3-Diphenylguanidine-1	N/A	Quantifiers	
88...	Sep2022_Gamou_1	Unknown	1,3-Diphenylguanidine-1	N/A	Quantifiers	
91...	Sep2022_HesieKawashima_1	Unknown	1,3-Diphenylguanidine-1	N/A	Quantifiers	

④-1 定量に先立ち、あらかじめ全試料、全物質についてXICを確認し、適切にpeak pickingが行われていることを確認する。例として以下のようなケースに該当する場合、不検出として処理されたり、部分的にしかピーク面積値が得られなかつたりする可能性があるので、都度対処する。

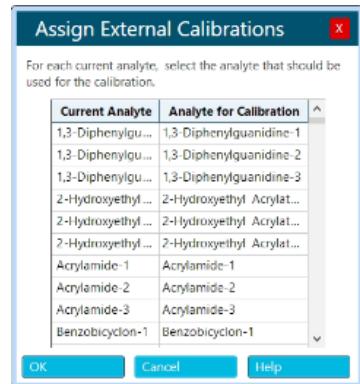
- ❖ Noise subtractの範囲がピークと重なっている→ドラッグしてsubtract範囲を移動させる
- ❖ ピーク割れが起きている→ピークを区切って面積値を算出するか、合算値を算出する
- ❖ ピーク形状等の関係で検出されていない→Manual integration modeを用いて、ピークのベースラインをドラッグするとピーク面積値が得られる。

④-2 □アイコン(Display the Calibration Curve)をクリックし検量線画面を表示する。

④-3 Option→Assign external calibration から検量線ファイルを読み込む。

④-4.新規ウインドウが開くので、このウインドウ上で.qmethodファイルで指定する物質名（画像左列）と.mqcalファイルで指定する物質名（画像右列）が互いに対応していることを確認する。通常は自動で設定されるため、操作不要。

④-5 ”Calculated Conc.”列に表示された値が、検量線により求められた各物質の濃度である。この時、原則として**各物質のプリカーサーイオン**について得られたCalculated Conc.を採用する。ただし、プリカーサーイオンのピークに問題がみられる場合には、プロダクトイオンのCalculated Conc.を採用する。固相抽出における濃縮倍率に鑑みて、これを1000で除した値を当該物質の実環境中濃度として扱う。表の適当な箇所で右クリックすると”Copy Entire Table”が表示されるため、表をコピーしてExcelにペーストするなどして、定量データを管理する（特定の列だけを選択してコピーペーストすることも可能）。



Appendix-1

※Mix_Posи.qmethodまたはMix_Nega.qmethodとは別に新規に解析メソッド作成する際には、Process New Results画面でNewを選択する（”6.分析データの解析”を参照）とUntitled Methodのウィンドウが新規に開くので、以下の操作によりメソッドを作成する。

②-1. 画面左のWorkflowにて”Quantitation and targeted identification”にチェックを入れる。

②-2. 画面左のComponentsにて物質名、中性状態での分子式、付加イオン形式などの値を入力する。その際、下記の点に留意する。

-1物質に対してプリカーサーイオン1種とプロダクトイオン2種を指定する。これら3種のイオンは同一の”Group”として管理される（下記画像のGroup列を参照）。また、3種のイオンを識別するため末尾に枝番を付与する。プリカーサーイオンは○○（物質名）-1、プロダクトイオンは○○-2または○○-3のように表記する（下記画像のName列を参照）。なおChemical formulaについては、3種のイオン全てに対して同一のものを使用する。

-物質に応じて、適宜付加イオン形式を選択する。通常、 $[M+H]^+$ または $[M-H]^-$ のいずれかとなるが、エトフェンプロックス-d5、ヒドロキノン、イベルメクチン、2-[(3-ドデカンアミドプロパン-1-イル)(ジメチル)アンモニオ]アセタートの4種については $[M+NH_4]^+$ を選択する。

-Componentsの表中には、分析対象物質とともに内標準物質9種も含める。内標準物質9種については、左端のIS列にチェックを入れる。

-Precursor Massは入力した分子式および付加イオン形式に応じて自動計算されるため、入力は不要。

-プロダクトイオンについては、別途、精密質量値を入力する。プリカーサーイオンについてはこの作業は不要であり、空欄とする。（下記画像のFragment Mass列参照）。

-XIC Widthは通常0.01 Daに設定する。SCIEX OSにおけるXIC Widthは理論質量値±0.005 Daとして扱われ、全体としてのWidthが0.01 Daとなる（理論質量値±0.01 Daではないので注意）。

-Retention Time Modeは通常”RT Value”に設定する。Retention Time (min)の列には、標準物質を実測して得られた保持時間を入力する。

-IS Name列にて、各物質に対して適用する内標準物質を選択する。左端IS列にてチェックを入れた物質のみ選択可能である。それぞれの実測保持時間に鑑みて、保持時間の差が最も小さいものを内標準物質として選択する。

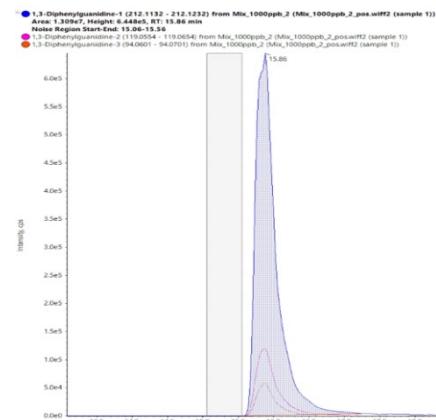
-Experiment Index列は自動入力されるため、操作は不要。

Workflow Components												
Row	IS	Group	Name	Chemical Formula	Adduct..	Precursor (Q1) Mass (Da)	Fragment Mass (Da)	XIC Width (Da)	Retention Time Mode	Retention Time (min)	IS Name	Experiment Index
1	<input type="checkbox"/>	1,3-Diisopropylguanidine	1,3-Diisopropylguanidine-1	C13H13N3	[M+H]+	212.1882		0.01	RT value	16.000	Methomyl-1	1+TOF MS (50 - 1...
2	<input type="checkbox"/>	1,3-Diisopropylguanidine	1,3-Diisopropylguanidine-2	C13H13N3	[M+H]+	212.1882	119.06037	0.01	RT value	16.000	Methomyl-2	1+TOF MS (50 - 1...
3	<input type="checkbox"/>	1,3-Diisopropylguanidine	1,3-Diisopropylguanidine-3	C13H13N3	[M+H]+	212.1882	94.06513	0.01	RT value	16.000	Methomyl-3	1+TOF MS (50 - 1...
4	<input type="checkbox"/>	2-Hydroxyethyl Acetate	2-Hydroxyethyl Acetate-1	C5H8O3	[M+H]+	117.05462	55.01784	0.01	RT value	2.200	Methamido-	1+TOF MS (50 - 1...
5	<input type="checkbox"/>	2-Hydroxyethyl Acetate	2-Hydroxyethyl Acetate-2	C5H8O3	[M+H]+	117.05462	55.01784	0.01	RT value	2.200	Methamido-	2+TOF MSMS (50 - 1...
6	<input type="checkbox"/>	2-Hydroxyethyl Acetate	2-Hydroxyethyl Acetate-3	C5H8O3	[M+H]+	117.05462	73.02081	0.01	RT value	2.200	Methamido-	2+TOF MSMS (50 - 1...
7	<input type="checkbox"/>	Acrylamide	Acryamide-1	C3H5NO	[M+H]+	72.04539		0.01	RT value	2.050	Methamido-	1+TOF MS (50 - 1...
8	<input type="checkbox"/>	Acrylamide	Acryamide-2	C3H5NO	[M+H]+	72.04539	55.01784	0.01	RT value	2.050	Methamido-	1+TOF MS (50 - 1...
9	<input type="checkbox"/>	Acrylamide	Acryamide-3	C3H5NO	[M+H]+	72.04539	54.03383	0.01	RT value	2.050	Methamido-	2+TOF MSMS (50 - 1...
10	<input type="checkbox"/>	Benzocyclo[2.2.1]hept-5-ene	Benzocyclo[2.2.1]hept-5-ene-1	C22H19OC	[M+H]+	447.24861		0.01	RT value	28.100	Imazal-d5-1	1+TOF MS (50 - 1...
11	<input type="checkbox"/>	Benzocyclo[2.2.1]hept-5-ene	Benzocyclo[2.2.1]hept-5-ene-2	C22H19OC	[M+H]+	447.24861	257.06008	0.01	RT value	28.100	Imazal-d5-1	2+TOF MSMS (50 - 1...
12	<input type="checkbox"/>	Benzocyclo[2.2.1]hept-5-ene	Benzocyclo[2.2.1]hept-5-ene-3	C22H19OC	[M+H]+	447.24861	226.02958	0.01	RT value	28.100	Imazal-d5-1	2+TOF MSMS (50 - 1...
13	<input type="checkbox"/>	Benzyl Butyl Phthalate	Benzyl Butyl Phthalate-1	C19H20O4	[M+H]+	313.14348		0.01	RT value	31.800	Imazal-d5-1	1+TOF MS (50 - 1...
14	<input type="checkbox"/>	Benzyl Butyl Phthalate	Benzyl Butyl Phthalate-2	C19H20O4	[M+H]+	313.14348	91.05423	0.01	RT value	31.800	Imazal-d5-1	1+TOF MS (50 - 1...
15	<input type="checkbox"/>	Benzyl Butyl Phthalate	Benzyl Butyl Phthalate-3	C19H20O4	[M+H]+	313.14348	149.02332	0.01	RT value	31.800	Imazal-d5-1	9+TOF MSMS (50 - 1...
16	<input type="checkbox"/>	Bromobutole	Bromobutole-1	C17H20Br	[M+H]+	312.09975		0.01	RT value	28.700	Imazal-d5-1	1+TOF MS (50 - 1...
17	<input type="checkbox"/>	Bromobutole	Bromobutole-2	C17H20Br	[M+H]+	312.09975	119.08553	0.01	RT value	28.700	Imazal-d5-1	9+TOF MSMS (50 - 1...
18	<input type="checkbox"/>	Bromobutole	Bromobutole-3	C17H20Br	[M+H]+	312.09975	137.9549	0.01	RT value	28.700	Imazal-d5-1	9+TOF MSMS (50 - 1...
19	<input type="checkbox"/>	Butachlor	Butachlor-1	C17H20ClN	[M+H]+	312.17248		0.01	RT value	32.700	Imazal-d5-1	1+TOF MS (50 - 1...

②-3. Integration→Options→Overlay Other Components for Groupを選択して、各物質のXICを確認する。画像のように、プリカーサーイオンとプロダクトイオン2種のピークトップが全て重なっている状態が理想的だが、物質によってはプロダクトイオンを観測できない場合もある。

図中の灰色の長方形はnoise subtractの区間を意味する。この区間がピークと重なると、ピークが観察されていても不検出として処理されるので注意する。

②-4. Integrationに係るパラメータは以下の表A-1のように設定する。



Integration 画面での XIC 描画例

表A-1 ピークピッキング条件

項目	設定値 (正イオン化)	設定値 (負イオン化)
XIC Width	0.01 Da	0.01 Da
RT Half Window	60.0 sec	60.0 sec
Update Expected RT	No	-
Peak selection by	-	Expected RT
Minimum Peak Width	3 points	-
Minimum Peak Height	100	100
S/N Integration Threshold	3	-
Minimal signal/noise	-	2.00 (Apply above parameters to Component)
Gaussian Smooth Width	1.0 points	-
Noise Percentage	5.0%	-
Baseline Subtract Window	0.03 min	-
Peak Splitting	2 points	-
Pre-Processing	-	Noise filterのみ使用
Integration	-	Interference resolution = 50%
Regression Parameter	Area	Area
Regression Type	Linear	Linear
Weighting Type	1/x	1/x

*特に記載のない限り、チェックボックス (Report Largest Peak, Optimize RT Half Windowなど) は使用しない。

②-5. その他の項目 (Library Search, Calculated Columns, Flagging Rules, Formula Finder) については操作不要。

②-6. 上記の設定を完了したら解析メソッドを保存し、Process New Resultsのウィンドウにて”Process”をクリックして解析を開始する。

Appendix-2

上記の外部検量線データの当てはめによる定量のほか、取得済みの標準物質の分析データを用いて、マニュアルで検量線を作成することも可能である。その場合、②-6までの解析手順を完了したのちに、以下の操作を行う。

-実際に調製した標準試薬の設定濃度と一致するように、表中の数値を書き換える。画面左の”Samples”で標準試薬の分析データを選択し、”Actual Concentration”の数値を適宜入力する。下記画像は0.1 ppbの例。0.2 ppbのデータを選択した場合、Actual Concentrationには0.2を入力する。他の標準試薬データについても同様。

Index	Sample Name	Sample Type	Component Name	Actual Concentration	Compon... Type
1	Mix_0.1ppb_1	Standard	1,3-Diphenylguanidine-1	0.10	Quantifiers
4	Mix_0.1ppb_1	Standard	2-Hydroxyethyl Acrylate-1	0.10	Quantifiers
7	Mix_0.1ppb_1	Standard	Acrylamide-1	0.10	Quantifiers
10	Mix_0.1ppb_1	Standard	Benzobicyclon-1	0.10	Quantifiers
13	Mix_0.1ppb_1	Standard	Benzyl Butyl Phthalate-1	0.10	Quantifiers
16	Mix_0.1ppb_1	Standard	Bromobutide-1	0.10	Quantifiers
19	Mix_0.1ppb_1	Standard	Butachlor-1	0.10	Quantifiers
25	Mix_0.1ppb_1	Standard	Cyanazine-1	0.10	Quantifiers
28	Mix_0.1ppb_1	Standard	Di-n-butyl phthalate-1	0.10	Quantifiers
31	Mix_0.1ppb_1	Standard	Diallyl Phthalate-1	0.10	Quantifiers
34	Mix_0.1ppb_1	Standard	Dicyclohexyl Phthalate-1	0.10	Quantifiers
37	Mix_0.1ppb_1	Standard	Dicyclohexylamine-1	0.10	Quantifiers
40	Mix_0.1ppb_1	Standard	Dimethyl Phthalate-1	0.10	Quantifiers
43	Mix_0.1ppb_1	Standard	Diphenylamine-1	0.10	Quantifiers
46	Mix_0.1ppb_1	Standard	Ethanolamine-1	0.10	Quantifiers

-全ての内標準物質の濃度を、実際の添加濃度と同じ値にする。下記画像は200 µg/Lの例。画像中では¹³C6-ジウロンを選択しているが、他8種の内標準物質についても同様に、Actual Concentrationを200に設定する。

Index	Sample Name	Sample Type	Component Name	Actual Concentration	Compon... Type
22	Mix_0.1ppb_1	Standard	13C6-DCMU	200.00	Internal Sta...
337	Mix_0.1ppb_2	Standard	13C6-DCMU	200.00	Internal Sta...
652	Mix_0.2ppb_1	Standard	13C6-DCMU	200.00	Internal Sta...
967	Mix_0.2ppb_2	Standard	13C6-DCMU	200.00	Internal Sta...
12...	Mix_0.4ppb_1	Standard	13C6-DCMU	200.00	Internal Sta...
15...	Mix_0.4ppb_2	Standard	13C6-DCMU	200.00	Internal Sta...
19...	Mix_1ppb_1	Standard	13C6-DCMU	200.00	Internal Sta...
22...	Mix_1ppb_2	Standard	13C6-DCMU	200.00	Internal Sta...
25...	Mix_2ppb_1	Standard	13C6-DCMU	200.00	Internal Sta...
28...	Mix_2ppb_2	Standard	13C6-DCMU	200.00	Internal Sta...
31...	Mix_4ppb_1	Standard	13C6-DCMU	200.00	Internal Sta...
34...	Mix_4ppb_2	Standard	13C6-DCMU	200.00	Internal Sta...
38...	Mix_10ppb_1	Standard	13C6-DCMU	200.00	Internal Sta...
41...	Mix_10ppb_2	Standard	13C6-DCMU	200.00	Internal Sta...
44...	Mix_20ppb_1	Standard	13C6-DCMU	200.00	Internal Sta...

-標準試薬と内標準物質の濃度を適切に設定できた場合、直線性のある検量線が得られる。適切な検量線が得られる物質が一つもない場合、設定値を見直す。

※外れ値と見られるプロットが含まれる場合などは、必要に応じて検量線に使用するプロットを除外/追加する。マスターテーブルの”Used”列にて操作可能である。

Appendix-3

上述の通り、保持時間補正にあたってはISの実測保持時間を使用している。これは、任意の分析対象成分Aのデータベース上の保持時間を t_{old} に補正係数Cを乗じて、補正後の予想保持時間 t_{new} を算出している。 t_{new} およびCの算出方法は下式に準じる。

$$t_{\text{new}} = C \cdot t_{\text{old}}$$
$$C = \frac{1}{2} \left(\frac{t_{\text{pre_new}}}{t_{\text{pre_old}}} + \frac{t_{\text{post_new}}}{t_{\text{post_old}}} \right)$$

式中の各パラメータの意味は、以下に示す通りである。

$t_{\text{pre_old}}$: t_R より保持時間が小さいISの中で最もAに近いもののデータベース上の保持時間

$t_{\text{pre_new}}$: 同ISの当該分析における実測保持時間

$t_{\text{post_old}}$: t_R より保持時間が大きいISの中で最もAに近いもののデータベース上の保持時間

$t_{\text{post_new}}$: 同ISの当該分析における実測保持時間

すなわち、近接するIS2種の保持時間変化率の平均をとり、これをCとして求めている。ただし上式は、成分Aを2種類の異なるISではさみこめる場合の計算方法である。9種類のISの中で最も保持が弱いものはMethamidophos-d6、最も強いものはEtofenprox-d5であるが、成分によってはMethamidophos-d6より保持が弱い、またはEtofenprox-d5よりも保持が強い場合がある。その場合は、Methamidophos-d6またはEtofenprox-d5のみ（1物質のみ）の保持時間変化率を用いて、予想保持時間を補正する。